

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K05181

研究課題名（和文）堅牢な有機フレーム内に柔軟なペプチド鎖をもつ低分子受容体ポケット多種類材料の創製

研究課題名（英文）Creation of a small molecule receptor with flexible peptide chains in a robust organic frame

研究代表者

古澤 宏幸（Furusawa, Hiroyuki）

山形大学・大学院基盤教育機構・教授

研究者番号：60345395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：数百種類の受容体で匂い分子を識別している生体の嗅覚システムを模倣した低分子認識システムを人工的な材料で実現するために、受容体ポケットのフレームワークとして共有結合性有機構造体を利用し、その支柱部分にジペプチドを組み込むことで生体類似の受容体ポケットを調製したところ、ジペプチドの有無や種類によって揮発性低分子の吸着量が異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、有機材料を組み合わせることでナノサイズの空間を創製できるのみならず、ジペプチドをはじめとした分子や各種官能基を導入することで化学的に分子環境の異なる場を提供できることを示すことができた。これらは人工的なバイオセンサーの受容体として活用できることから、より多品種の分子に対応した分子センサー応用に展開でき、バイオセンサーの社会実装を促進すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to realize a small molecule recognition system that mimics the olfactory system of living organisms, in which odor molecules are identified by hundreds of different receptors, we prepared a biomimetic receptor pocket by using a covalent organic framework for the receptor pocket and incorporating a dipeptide into its supporting portion. We found that the amount of volatile small molecules adsorbed differed depending on the presence or absence and type of dipeptide.

研究分野：バイオセンサー

キーワード：水晶振動子微量天秤 共有結合有機構造体 気化分子相互作用 受容体 分子認識 バイオセンサー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、自動車の自動運転をはじめとしてさまざまな装置開発が自動化をキーワードに活気を帯びている。背景には人工知能 (AI) の技術的な発展があり従来装置への組み込みで省力化や効率化が期待されていることがある。こうした自立型のシステムに対しては生体と同様に周囲の状況を把握する各種センサーの需要がますます高くなると想定される。生体 (ヒト) の感覚器官 (五感) に相当する視覚 (光) や聴覚 (音) 触覚 (圧力) 用の物理センサーはスマートフォンにも搭載されるほど実用化されている。一方で味覚や嗅覚については、例えば、匂い分子など数万種あると言われる化学物質を検出する必要があることもあり、匂いを嗅ぎ分けられるようなユニット化されたセンサーの実用についてはまだ検討段階である。

揮発性有機化合物 (volatile organic compounds; VOCs) を含む低分子化合物の『検出』に対して最も一般的な分析技術はカラムクロマトグラフィーによる分離同定である。しかし、カラムクロマトグラフィーによる時間的分離法では瞬時に判断可能なセンサー用途には不向きである。これらの解決には、生体の嗅覚システムが採用する多種類の受容体を用意し並列処理的分離に基づく検出技術を人工的に実現する方法が考えられた。

生体嗅覚システムでは低分子量有機分子を数百種存在すると言われている嗅覚細胞膜上の受容体ポケットで捕捉し、各受容体の構造変化が誘起されることをトリガーとして各細胞の膜電位変化へとシグナル変換の後、脳内で情報パターン認識を行っている。生体類似の人工受容体ポケットを多種類、用意することが生体嗅覚システムの模倣で重要である。

これまで人工的な受容体として、核酸やペプチドなど生体高分子の折りたたみを利用して受容体を作製する方法、合成高分子の鋳型重合、シクロデキストリンなど環状分子を利用したもの、などが提案されてきた。しかし、共通した構造で数百もの種類で系統的に受容体を調製することは難しいのが現状であった。多種類の受容体を系統的に作成できる方法が検討されていた。

共有結合性有機構造体 (Covalent Organic Framework: COF) は、3～4分岐構造の分子をリンカー分子で架橋して二次元もしくは三次元の大きな規則正しいネットワークを形成させたものである。活性炭やゼオライトをはるかに超える表面積をもつナノポーラス材料となることから、ガス吸着や分離、貯蔵材料として注目されている。リンカー分子には芳香環をもつ硬い分子が利用される。すなわち、COF のフレームワークを利用することで受容体ポケットと類似の官能基が提示されている空間を作り出すことができることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、立体構造体である COF に生体由来であるペプチドを組み込んだ新たなバイオ-ナノ構造材料を創造することを目的とした。生体の嗅覚システム類似の低分子検出への応用を目指した。リンカーの支柱部分に 1～2 残基のアミノ酸残基を導入することで、その組み合わせ (20×20) から数百種類のさまざまなペプチドを提示した COF ポケットを調製可能である。検出にナノグラムの質量を振動で検出することができる水晶振動子微量天秤装置を用いて、立体構造体 COF の中にさまざまな低分子化合物が取り込まれるかどうかを質量応答として評価することを試みることにし、平滑なセンサー基板上に COF-ペプチド鎖-構造体の薄膜を調製して、揮発性低分子を基板上の構造体に作用させて、その時の水晶振動子の応答変化を観察することとした。複数のペプチド鎖を提示した立体構造体を調製し、生体嗅覚システムのようなパターン認識

に応用可能か検討することを目標とした。

3. 研究の方法

共有結合性有機構造体の2つの部品として分岐構造をもつ化合物にアミノ基、それらをつなぐリンカー化合物にカルボン酸をもつものを選択し、縮合剤とともにセンサー基板表面に塗布して共有結合性有機構造体を成膜した。リンカー部分にジペプチドを導入した修飾リンカーを用いて同様に成膜したものと比較を行った。センサーとして、水晶振動子微量天秤装置の他に、電気化学バイオセンサーを用いた場合も検討した。

4. 研究成果

(1) 溶媒効果

共有結合性有機構造体を調製する際には、分岐構造を持つ化合物およびリンカー化合物に加え縮合剤のそれぞれ所定量を溶媒中で混合させて行った。調製は水晶振動子微量天秤のセンサー表面で行い、構造体の生成の様子を成膜前後の質量を測定することで行った。各試薬の溶解度が大きく異なるため、用いる溶媒によっては全てが溶解しないことがあったが、ジメチルスルホキシドを用いたときに構造体生成による質量増加が確認され、および、縮合反応効率や取り扱いの上で優れていることが確認できた。

(2) ペプチドの効果

入手が容易な天然アミノ酸の組み合わせは20x20種類の400通りあるが、予備的な実験として化学的環境の差異が出やすく評価がしやすいように、疎水的な側鎖を持つバリンのジペプチド(VV)、親水的な-OH側鎖を持つセリンのジペプチド(SS)、負電荷を持つアスパラギン酸のジペプチド(DD)の3種類を検討した。これらのジペプチドは、N末側はアセチル化保護し、C末側は活性化エステルとして準備した。ジペプチドの化学的物性の評価のため、水晶振動子微量天秤のセンサー基板上に直接的に各ジペプチドの層を一層形成させて、気化アルコールおよび水等を作用させた際の相互作用する様子を質量増加で評価したところ、気化エタノールはいずれの表面とも相互作用したが、気化水は疎水的なVV表面には作用しなかった。ジペプチドのアミノ酸配列によって化学的環境の異なる場を作り出せることが確認された。

(3) ゲスト分子の効果

ジペプチドの提示された空間の評価のため、共有結合性有機構造体をCOF-ジペプチド鎖-構造体の薄膜として水晶振動子微量天秤センサー表面上に調製し、続いてガスフロー装置にセットしたセンサー表面に気化分子として低分子アルコール類やケトン、エステル分子等をフローし作用させ、COF薄膜に取り込まれたことによる質量変化により相互作用能を評価したところ、気化低分子アルコール類は親水的なジペプチドをもつ表面に応答し他の基板では顕著な変化は見られなかった。一方、気化ケトン・エステル類は互いに類似の作用パターンを示したが、必ずしも側鎖官能基のみで説明できる挙動ではないことが示された。また、気相だけでなく水中で同様の評価を行ったところ、気相の場合とはまた異なる作用挙動を示した。以上のことから、現象説明にはさらなる考察が必要だが、ジペプチドの種類によって3次元的ナノ空間に分子環境の異なる場を作り出せることが確認できた。

(4) 課題

評価デバイスとして簡易なセンサーチップが利用できる電気化学バイオセンサーとの組み合わせを検討したが、気相中で電気化学測定を行う際に電極上の乾燥回避用のヒドロゲルを被覆したため気相分子の応答が遅くなったことから、本研究での評価方法としては水晶振動子微量

天秤装置での評価となった。

ジペプチドを組み込んだ共有結合有機構造体 (COF) を調製して得られた 3 次元的ナノ薄膜はジペプチドの種類に依存した作用物性を示すことが確認できた。生体類似の受容体ポケット・フレームワークが構築できる可能性が得られた一方で、得られている気化分子と COF-ジペプチドの相互作用する組み合わせに対する説明がそれぞれの化学的性質のみに基づく考察では説明が難しい観察結果が得られるケースもあった。結果検証を化学的性質だけでなく様々な視点に基づいて検討することが必要であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kai Sasaki, Hiroyuki Furusawa, Kuniaki Nagamine, and Shizuo Tokito	4. 巻 5
2. 論文標題 Constructive Optimization of a Multi-Enzymatic Film based on a Cascade Reaction for Electrochemical Biosensors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 32844-32851
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.0c05521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimine Hiroshi, Sasaki Kai, Furusawa Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Pocketable Biosensor Based on Quartz-Crystal Microbalance and Its Application to DNA Detection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 281 ~ 281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s23010281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 佐々木開、古澤宏幸、長峯邦明、時任静士
2. 発表標題 電荷蓄積法を用いた酵素-電気化学的な低分子化合物の高感度検出
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木開、吉嶺浩司、古澤宏幸
2. 発表標題 交通系ICカードサイズの水素振動子バイオセンサーの開発とDNA検出への応用
3. 学会等名 2022年第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古澤宏幸、高津桃世
2. 発表標題 生体分子を活用および組み込んだフレームワークの構築とその応用
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 センサ装置および周波数計測方法	発明者 吉嶺浩司、古澤宏幸	権利者 ビエソパーツ株式会社、山形大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-145610	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関